

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-522751

(P2002-522751A)

(43)公表日 平成14年7月23日(2002.7.23)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコト <sup>*</sup> (参考)
G 0 1 N	33/574	G 0 1 N	33/574
A 6 1 K	39/395	A 6 1 K	39/395
49/00		49/00	C
51/00		A 6 1 P	35/00

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁に統ぐ

(21)出願番号 特願2000-563832(P2000-563832)  
(86) (22)出願日 平成11年7月22日(1999.7.22)  
(85)翻訳文提出日 平成13年2月5日(2001.2.5)  
(86)国際出願番号 PCT/US99/16811  
(87)国際公開番号 WO00/08210  
(87)国際公開日 平成12年2月17日(2000.2.17)  
(31)優先権主張番号 60/095, 232  
(32)優先日 平成10年8月4日(1998.8.4)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,  
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I  
T, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, U  
S

(71)出願人 ダイアデクスアス・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国カリフォルニア州95054,  
サンタ・クララ, オクタヴィアス・ドライ  
ブ 3303  
(72)発明者 スン, ヨンミン  
アメリカ合衆国カリフォルニア州95128,  
サン・ホセ, サウス・ウィンチester・  
ブルヴァード 869, アパートメント  
260  
(74)代理人 弁理士 杉本 一夫 (外5名)

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 乳癌を診断、監視、病期決定、造影及び治療する新規な方法

(57)【要約】

本発明は、乳癌を検出、診断、監視、病期決定、予知、  
造影及び治療する新規な方法を提供する。

**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 患者において乳癌の存在を診断する方法であって、

( a ) 前記患者の細胞、組織又は体液における BSG のレベルを測定すること；及び

( b ) 測定された BSG のレベルを正常なヒト対照由来の細胞、組織又は体液の BSG のレベルと比較することを含んでなり、正常なヒト対照に対する患者の測定された BSG レベルの変化が乳癌の存在に関連づけられる、前記方法。

【請求項 2】 乳癌を有する患者の転移乳癌を診断する方法であって、

( a ) 転移したことが知られていない乳癌を有する患者を同定すること；

( b ) 前記患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルにおける BSG のレベルを測定すること；及び

( c ) 測定された BSG レベルを正常なヒト対照の細胞、組織又は体液型の BSG レベルと比較することを含んでなり、正常なヒト対照に対する患者の測定 BSG レベルの変化が転移した乳癌に関連づけられる、前記方法。

【請求項 3】 患者の乳癌を病期決定する方法であって、

( a ) 乳癌を有する患者を同定すること；

( b ) 前記患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルにおける BSG のレベルを測定すること；及び

( c ) 測定された BSG レベルを正常なヒト対照サンプルの細胞、組織又は体液型の BSG レベルと比較することを含んでなり、正常なヒト対照に対する前記患者の測定された BSG レベルの変化が、進行しているか又は退縮している、又は寛解状態にある癌に関連づけられる、前記方法。

【請求項 4】 乳癌を有する患者の乳癌を転移の発症について監視する方法であって、

( a ) 転移したことが知られていない乳癌を有する患者を同定すること；

( b ) 前記患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルにおける BSG レベルを定期的に測定すること；及び

( c ) 測定された BSG レベルを正常なヒト対照の細胞、組織又は体液型の BSG レベルと比較することを含んでなり、正常なヒト対照に対する患者の BSG

レベルの変化が転移した癌に関連づけられる、前記方法。

【請求項5】 乳癌を有する患者の乳癌の段階変化を監視する方法であつて

(a) 乳癌を有する患者を同定すること；

(b) 前記患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルにおけるB S Gレベルを定期的に測定すること；及び

(c) 測定されたB S Gレベルを正常なヒト対照の細胞、組織又は体液型のB S Gレベルと比較することを含んでなり、正常なヒト対照に対する患者の測定されたB S Gレベルの変化が、段階において進行している、段階において退行している、又は寛解状態にある癌に関連づけられる、前記方法。

【請求項6】 前記患者における乳癌の存在、転移又は進行に関連づけられる変化が、患者の測定されたB S Gレベルの増加であつて、B S GがMam001(SEQ ID NO:2)、Mam004(SEQ ID NO:4)又はMam005(SEQ ID NO:3)を含む、請求項1、2、3、4又は5に記載の方法。

【請求項7】 前記患者における乳癌の存在、転移又は進行に関連づけられる変化が、患者の測定されたB S Gレベルの減少であつて、B S GがMam002(SEQ ID NO:1)を含む、請求項1、2、3、4又は5に記載の方法。

【請求項8】 前記患者における乳癌の退縮又は寛解に関連づけられる変化が、患者の測定されたB S Gレベルの減少であつて、B S GがMam001(SEQ ID NO:2)、Mam004(SEQ ID NO:4)又はMam005(SEQ ID NO:3)を含む、請求項3又は5に記載の方法。

【請求項9】 前記患者における乳癌の退縮又は寛解に関連づけられる変化が、患者の測定されたB S Gレベルの増加であつて、B S GがMam002(SEQ ID NO:1)を含む、請求項3又は5に記載の方法。

【請求項10】 B S GがMam001(SEQ ID NO:2)、Mam004(SEQ ID NO:4)又はMam005(SEQ ID NO:3)を含む、前記B S Gに対する抗体。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の抗体を患者へ投与することを含んでなる、患者の乳癌を造影する方法。

【請求項 12】 前記抗体が常磁性イオン又は放射性同位体で標識されている、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】 請求項 10 に記載の抗体を患者へ投与することを含んでなる、患者の乳癌を治療する方法。

【請求項 14】 抗体が細胞毒性薬に結合している、請求項 13 に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****発明の分野**

本発明は、癌、特に乳癌を検出、診断、監視、病期決定、予知、造影及び治療するために新規に開発されたアッセイに一部関する。

**背景技術**

アメリカ人女性では、平均寿命を85歳として、その9人に1人が人生のある時期に乳癌を発症する。年間、18万人以上の米国女性が乳癌と診断され、約46,000人がこの疾患で死亡する。

**【0002】**

どんな女性も乳癌に罹る危険がある。乳癌を発症する可能性は加齢とともに増加する；癌が発見される女性の80%は50歳以上である。女性の発癌可能性を高め得るいくつかの危険因子も存在する。この疾患の家族歴を有する女性、30歳以後に最初の子供を産んだか、又は子供を産んだことのない女性、月経が早い時期に始まった女性は、そのリスクが高い可能性がある。

**【0003】**

しかしながら、乳癌を発症する女性の70%以上で既知の危険因子がない。1994年に発見されたBRCA1遺伝子との関連が考えられる乳癌の症例は10%に満たない。研究者たちは、栄養、アルコール、運動、喫煙、及び経口避妊薬のような他の因子が癌の予防に果たし得る役割について研究している。

**【0004】**

他の癌と同じように、乳癌が成功裡に治療される可能性が最も高いのは早期に発見されるときである。乳房の特殊なX線写真であるマンモグラムは、全乳癌の90%以上を検出し得る。乳癌は、早期に発見されれば、治癒の可能性は90%以上である。治療オプションには、癌の病期（ステージ）により、外科手術、化学療法、及び放射線療法がある。

**【0005】**

乳癌の検出、診断、監視、病期決定、予知及び造影するために使用される方法は、患者のアウトカムにとってきわめて重要である。早期乳癌と診断された患者

の5年生存率は、遠隔転移乳癌と診断された患者の5年生存率に比較してずっと高い。早期乳癌を検出するためのより高感度で特異的な新しい診断法が必要とされているのは明らかである。

#### 【0006】

乳癌患者は、初回治療後、及びアジュvant治療の間に綿密に監視され、治療に対する応答性が判定され、持続性又は再発性の転移疾患が検出される。乳癌、及びその再発及び進行を検出する、より高感度で特異的な乳癌マーカーに対するニーズがあるのも明らかである。

#### 【0007】

乳癌を管理するもう1つの重要な工程は、患者の疾患の病期を決定することである。病期決定には潜在的な予後価値があり、最適治療法を設計するための判断基準を提供する。一般に、乳癌の病理学的な病期決定が臨床的な病期決定より好ましいのは、前者がより正確な予後をもたらすからである。しかしながら、臨床的病期決定も、病理学的病期決定と少なくとも同じくらい正確であったならば、好ましいことであろう。なぜなら、病理学的評価のために組織を採取する侵襲的な方法に依存しないからである。乳癌の病期決定は、様々な浸潤段階を差別化し得る、細胞、組織又は体液内の新しいマーカーを検出することができれば、改善されることだろう。

#### 【0008】

本発明では、9種の乳癌特異遺伝子 (Breast Specific Genes; BSG) を介して乳癌を検出、診断、監視、病期決定、予知、造影及び治療する方法が提供される。9種のBSGは、SEQ ID NO: 1~9のいずれかのポリヌクレオチド配列を含んでなる遺伝子により発現されるネーティブタンパク質を特に意味する。他のやり方では、本明細書で使用されるように、9種のBSGにより意味されるものは、SEQ ID NO: 1~9のポリヌクレオチド配列のいずれかを含んでなる遺伝子によりコードされるネーティブmRNAを意味するか、又はそれはSEQ ID NO: 1~9のポリヌクレオチド配列のいずれかを含んでなる遺伝子そのものを意味する。

#### 【0009】

本発明の他の目的、特徴、効果及び側面は、以下の説明から当業者に明らかになるだろう。しかしながら、以下の説明及び特定の実施例は、本発明の好ましい態様を示すものであって、例示のためだけのものである。この開示される発明の精神及び範囲のなかで様々な変更及び改良をすることは、以下の説明を読むこと、及び本開示の他の部分を読むことから、当業者にはすぐに明らかであろう。

#### 発明の要約

上記及び他の目的のために、細胞、組織又は体液のB S Gのレベルを、正常なヒト対照の好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと比較したときの変化について分析することによって乳癌の存在を診断する方法を提供することが本発明の目的であり、ここでは正常なヒト対照に対する患者のB S Gレベルの変化が乳癌に関連づけられる。

#### 【0010】

さらに提供されるのは、転移した乳癌を有する疑いのあるヒト患者を同定すること；そのような患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルをB S Gについて分析すること；そのような細胞、組織又は体液のB S Gレベルを、正常なヒト対照の好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと比較することによって、転移したことが知られていないような癌を有する患者において転移乳癌を診断する方法であり、ここでは正常なヒト対照に対する患者のB S Gレベルの変化が転移した癌に関連づけられる。

#### 【0011】

本発明によりまた提供されるのは、乳癌を有するヒト患者を同定すること；そのような患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルをB S Gについて分析すること；そのような細胞、組織又は体液のB S Gレベルを正常なヒト対照サンプルの好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと比較することによって、そのような癌を有するヒトの乳癌を病期決定する方法であり、ここでは正常なヒト対照に対する前記患者のB S Gレベルの変化が進行しているか又は退縮している、又は寛解状態にある癌に関連づけられる。

#### 【0012】

さらに提供されるのは、乳癌を有するヒトの乳癌を転移の発症について監視す

る方法である。この方法は、転移したことが知られていない乳癌を有するヒト患者を同定すること；そのような患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルをB S Gについて定期的に分析すること；そのような細胞、組織又は体液のB S Gレベルを正常なヒト対照サンプルの好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと比較することを含み、ここでは正常なヒト対照に対する患者のB S Gレベルの変化が転移した癌に関連づけられる。

#### 【0013】

さらに提供されるのは、乳癌を有する患者のB S Gのレベルを注視することによって、そのような癌を有するヒトの乳癌の段階変化を監視する方法である。この方法は、そのような癌を有するヒト患者を同定すること、そのような患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルをB S Gについて定期的に分析すること；そのような細胞、組織又は体液のB S Gレベルを正常なヒト対照サンプルの好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと比較することを含み、ここでは正常なヒト対照に対する患者のB S Gレベルの変化が進行しているか又は退行している、又は寛解状態にある癌に関連づけられる。

#### 【0014】

さらに提供されるのは、疾患又は病態を検出又は診断する目的で患者のB S Gの局在化を検出又は造影するために使用し得る、B S Gに対する抗体、又はそのような抗体のフラグメントである。そのような抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであり得るか、又は分子生物学の技術によって製造し得る。本文及び本明細書を通して使用されるように、「抗体」という用語は、S E L E Xとして言及され、当業者によく知られている *in vitro* 進化のプロトコールから派生するようなアブタマー及び单鎖オリゴヌクレオチドも包含することを意味する。抗体は、多様な検出ラベルで標識され得るが、それには、限定しないが、放射性同位体及び常磁性金属が含まれる。これらの抗体又はそのフラグメントはまた、B S Gの発現により特徴づけられる疾患の処置における治療薬として使用され得る。治療応用では、抗体は、放射性同位体、酵素、毒素、薬物又はプロドラッグのような細胞毒性薬へ誘導化するか又は誘導化せずに使用し得る。

#### 【0015】

本発明の他の目的、特徴、効果及び側面は、以下の説明から当業者に明らかになるだろう。しかしながら、以下の説明及び特定の実施例は、本発明の好ましい態様を示すものであって、例示のためだけのものである。この開示される発明の精神及び範囲のなかで様々な変更及び改良をすることは、以下の説明を読むこと、及び本開示の他の部分を読むことから、当業者にはすぐに明らかであろう。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、B S Gのレベルを正常なヒト対照のB S Gレベルと比較することによって、癌を検出、診断、監視、病期決定、予知及び造影するための、定量的かつ定性的な診断アッセイ及び方法に関する。本明細書で使用されるように、B S Gのレベルとは、SEQ ID NO: 1~9のいずれかのポリヌクレオチド配列を含んでなる遺伝子により発現されるネーティブなタンパク質のレベルを意味する。他のやり方では、本明細書で使用されるように、B S Gのレベルとは、SEQ ID NO: 1~9のポリヌクレオチド配列のいずれでも含んでなる遺伝子のいずれでもコードされるネーティブなmRNAのレベル、又はSEQ ID NO: 1~9のポリヌクレオチド配列のいずれでも含んでなる遺伝子のレベルを意味する。そのようなレベルは、好ましくは細胞、組織及び/又は体液の少なくとも1つで測定され、正常及び異常なレベルの定量も含まれる。このように、例えば、正常な対照の体液、細胞又は組織のサンプルに比較してB S Gタンパク質群の1つのレベルにおける変化を測定する、本発明による診断アッセイは、乳癌を含む、癌の存在を診断するために使用され得る。「変化」とは、B S Gレベルの増加又は減少のいずれかを意味する。例えば、Mam001(SEQ ID NO: 2)、Mam004(SEQ ID NO: 4)及びMam005(SEQ ID NO: 3)のようなB S Gでは、正常なヒト対照に比較したレベルの増加が、乳癌、その癌の転移及び進行に関連しているのに対し、レベルの減少は退縮及び/又は寛解に関連づけられる。B S G Mam002(SEQ ID NO: 1)では、正常なヒト対照に比較したレベルの減少が、乳癌、転移及び進行に関連しているのに対し、増加は退縮及び/又は寛解に関連づけられる。9種のB S Gは、本発明の方法において、単独でか、又はその9種のすべて一緒にか又は任意の組合せで測定され得る。

### 【0016】

本発明のすべての方法は、B S Gだけでなく他の癌マーカーのレベルを測定することも所望により包含し得る。B S Gだけでなく、B R C A 1のような他の癌マーカーも当技術分野で知られている。

### 診断アッセイ

本発明は、細胞、組織又は体液のB S Gのレベルを、正常なヒト対照の好ましくは同一タイプの細胞、組織又は体液のB S Gのレベルと比較したときの変化について分析することによって乳癌の存在を診断する方法を提供する。本明細書で示されるように、正常なヒト対照に対して患者でM a m 0 0 1 ( S E Q   I D   N O : 2 ) 、 M a m 0 0 4 ( S E Q   I D   N O : 4 ) 又はM a m 0 0 5 ( S E Q   I D   N O : 3 ) のようなB S Gのレベルが増加していることが乳癌の存在に関連づけられるのに対し、正常なヒト対照に対して患者でM a m 0 0 2 ( S E Q   I D   N O : 1 ) のようなB S Gのレベルが減少していることが乳癌の存在に関連づけられる。

### 【0017】

本発明を限定しないが、一般に、定量的な診断アッセイでは、試験される患者が癌を有することを示す陽性の結果とは、B S Gのような癌マーカーの細胞、組織又は体液レベルが、正常なヒト対照の好ましくは同一の細胞、組織又は体液よりも少なくとも2倍高いか又は低い、最も好ましくは、少なくとも5倍高いか又は低いものである。

### 【0018】

本発明はまた、まだ転移していない乳癌を有する患者の転移乳癌を、転移の発症について診断する方法を提供する。本発明の方法では、転移した可能性がある（が転移したことは知られていない）乳癌を有することが疑われるヒト癌患者が同定される。このことは当業者に知られた様々な手段により達成される。例えば、乳癌の場合、一般に患者は従来的な検出法に従って乳癌と診断される。

### 【0019】

本発明では、細胞、組織又は体液のB S Gレベルの存在を決定することは、転移していない乳癌と転移した乳癌とを区別するために特に有用である。現存の技

術では転移した乳癌と転移していない乳癌とを区別することが難しく、適切な治療の選択はそのような知識にしばしば左右される。

### 【0020】

本発明では、そのような細胞、組織又は体液で測定される癌マーカーはB S Gであり、そのレベルが正常なヒト対照の好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと比較される。つまり、観察される癌マーカーが血清のB S Gであれば、このレベルが、好ましくは正常ヒト患者の血清のB S Gレベルと比較される。正常なヒト対照に対して患者でMam001 (SEQ ID NO: 2)、Mam004 (SEQ ID NO: 4) 又はMam005 (SEQ ID NO: 3) のようなB S Gのレベルが増加していることが転移した乳癌に関連づけられるのに対し、正常なヒト対照に対して患者でMam002 (SEQ ID NO: 1) のようなB S Gが減少していることが転移した乳癌に関連づけられる。

### 【0021】

本発明を限定しないが、一般に、定量的な診断アッセイでは、試験されるか又は監視される患者の癌が転移したことを示す陽性の結果とは、B S Gのような癌マーカーの細胞、組織又は体液レベルが、正常患者の好ましくは同一の細胞、組織又は体液より少なくとも2倍高いか又は低い、最も好ましくは、少なくとも5倍高いか又は低いものである。

### 【0022】

本明細書で使用される正常なヒト対照には、癌を有さないヒト患者、及び / 又はその患者由来の非癌性サンプルが含まれ；転移について診断又は監視する方法では、正常なヒト対照は、好ましくは、転移してない乳癌を有すると信頼し得る方法により判定されているヒト患者由来のサンプル、例えば同一の患者のより初期のサンプルを含む。

#### 病期決定(ステージング)

本発明はまたヒト患者の乳癌を病期決定する方法を提供する。

### 【0023】

本方法は、そのような癌を有するヒト患者を同定すること；そのような患者由

來の細胞、組織又は体液のサンプルをB S Gについて分析することを含む。次いで、この方法ではそのような細胞、組織又は体液のB S Gレベルが正常なヒト対称のサンプルの好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと比較され、ここでは正常なヒト対照に対して患者でM a m 0 0 1 ( S E Q I D N O : 2 )、M a m 0 0 4 ( S E Q I D N O : 4 )又はM a m 0 0 5 ( S E Q I D N O : 3 )のようなB S Gのレベルが増加しているか、又はM a m 0 0 2 ( S E Q I D N O : 1 )のようなB S Gのレベルが減少していることが進行している癌に関連づけられ、M a m 0 0 1 ( S E Q I D N O : 2 )、M a m 0 0 4 ( S E Q I D N O : 4 )又はM a m 0 0 5 ( S E Q I D N O : 3 )のようなB S Gのレベルが減少しているか、又はM a m 0 0 2 ( S E Q I D N O : 1 )のようなB S Gのレベルが増加していることが退縮しているか又は寛解状態にある癌に関連づけられる。

#### 監視(モニタリング)

さらに提供されるのは、乳癌を有するヒトの乳癌を転移の発症について監視する方法である。この方法は、転移したことが知られていないそのような癌を有するヒト患者を同定すること；そのような患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルをB S Gについて定期的に分析すること；そのような細胞、組織又は体液のB S Gレベルを正常なヒト対照サンプルの好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと比較することを含み、ここでは正常なヒト対照に対して患者でM a m 0 0 1 ( S E Q I D N O : 2 )、M a m 0 0 4 ( S E Q I D N O : 4 )又はM a m 0 0 5 ( S E Q I D N O : 3 )のようなB S Gのレベルが増加しているか、又はM a m 0 0 2 ( S E Q I D N O : 1 )のようなB S Gのレベルが減少していることが転移した癌に関連づけられる。

#### 【0024】

本発明によりさらに提供されるのは、乳癌を有するヒトにおいてその癌の段階変化を監視する方法である。この方法は、そのような癌を有するヒト患者を同定すること；そのような患者由来の細胞、組織又は体液のサンプルをB S Gについて定期的に分析すること；そのような細胞、組織又は体液のB S Gレベルを正常なヒト対照サンプルの好ましくは同一型の細胞、組織又は体液のB S Gレベルと

比較することを含み、ここでは正常なヒト対照に対して患者でMam001 (SEQ ID NO: 2)、Mam004 (SEQ ID NO: 4) 又はMam005 (SEQ ID NO: 3) のようなBSGのレベルが増加しているか、又はMam002 (SEQ ID NO: 1) のようなBSGのレベルが減少していることが段階において進行している癌に関連づけられ、Mam001 (SEQ ID NO: 2)、Mam004 (SEQ ID NO: 4) 又はMam005 (SEQ ID NO: 3) のようなBSGのレベルが減少しているか、又はMam002 (SEQ ID NO: 1) のようなBSGのレベルが増加していることが段階において退行しているか又は寛解状態にある癌に関連づけられる。

#### 【0025】

そのような患者を転移の発症について監視することは定期的であり、好ましくは四半期ベースでなされる。しかしながら、当該の癌、特定の患者、及び癌の段階によっては頻度を増減してよい。

#### アッセイ技術

ある宿主に由来するサンプルにおいて、本発明のBSGのような遺伝子発現のレベルを定量するために使用し得るアッセイ技術は、当業者によく知られている。そのようなアッセイ方法には、ラジオイムノアッセイ、逆転写酵素PCR (RT-PCR) アッセイ、免疫組織化学アッセイ、in situ ハイブリダイゼーションアッセイ、競合的結合アッセイ、ウェスタンプロット分析、ELISAアッセイ及びプロテオミック・アプローチが含まれる。上記のなかで、生物学的流体における遺伝子の発現タンパク質を診断するためにしばしば好ましいのはELISAである。

#### 【0026】

ELISAアッセイは、先ず、市販品から容易に入手し得ない場合は、BSGに対する特異抗体、好ましくはモノクローナル抗体を製造することを含む。さらに、一般に、BSGと特異的に結合するレポーター抗体が製造される。このレポーター抗体には、放射活性、蛍光、又は酵素の試薬のような検出可能な試薬、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素又はアルカリホスファターゼが付けられる

◦  
【0027】

E L I S A を実行するには、B S G に特異的な抗体を、この抗体に結合する固形支持体、例えばポリスチレンディッシュ上でインキュベートする。さらにウシ血清アルブミンのような非特異的なタンパク質とインキュベートすることによって、ディッシュ上のフリーなタンパク質結合部位がカバーされる。次に、分析すべきサンプルをこのディッシュの中でインキュベートすると、その間に、ポリスチレンディッシュに付いた特異抗体に B S G が結合する。未結合のサンプルを緩衝液で洗い落とす。B S G 特異的に向かって西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したレポーター抗体をディッシュに入れる、B S G に結合したモノクローナル抗体にこのレポーター抗体が結合する。結合しなかったレポーター抗体を洗い流す。比色基質を含むペルオキシダーゼ活性用の試薬をディッシュに加える。B S G 抗体に連結した固定化ペルオキシダーゼにより発色した反応生成物が產生される。ある一定時間において発現した色の量は、サンプルに存在する B S G タンパク質の量に比例している。一般に、標準曲線を参照にして定量的な結果を得る

◦  
【0028】

競合アッセイを利用することも可能であり、ここでは固形支持体及び標識された B S G に付いた B S G の特異抗体と宿主由来のサンプルを固形支持体に通過させ、固形支持体に付いた検出ラベルの量をサンプル中の B S G 量に相関させる。

## 【0029】

核酸法は、B S G の m R N A を乳癌のマーカーとして検出するために使用し得る。ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 及び、リガーゼ連鎖反応 ( L C R ) 及び核酸配列ベースの增幅 ( N A S A B A ) のような他の核酸法が、様々な悪性疾患の診断及び監視用に悪性腫瘍細胞を検出するために使用し得る。例えば、逆転写酵素 P C R ( R T - P C R ) は、数千もの他の m R N A 種の複雑な混合物において特定の m R N A 集団の存在を検出するために使用し得る強力な技術である。R T - P C R では、先ず酵素の逆転写酵素を使用して m R N A 種が相補 D N A ( c D N A ) へ逆転写される；次いでこの c D N A を標準的な P C R 反応において増幅

する。このように R T - P C R の増幅により、ある単一の m R N A 種の存在を示し得る。従って、この m R N A がそれを産生する細胞にごく特異的であれば、R T - P C R を使用して特定タイプの細胞の存在を同定し得る。

### 【0030】

固体支持体上にアレイ配列された（即ち、グリッティング）クローン又はオリゴヌクレオチドに対するハイブリダイゼーションを使用して、当該遺伝子の発現を検出すること、及びその発現レベルを定量することが可能になる。このアプローチでは、B S G 遺伝子をコードする c D N A が基質に固定されている。この基質は好適なタイプのものであり得るが、限定せずに、ガラス、ニトロセルロース、ナイロン又はプラスチックを包含する。B S G 遺伝子をコードする D N A の少なくとも一部分を基質に付け、次いで分析物とインキュベートするが、これは関心対象の組織から単離された、R N A 又はその R N A の相補 D N A ( c D N A ) であり得る。基質に結合した D N A と分析物とのハイブリダイゼーションは、様々な手段により検出及び定量され得るが、それには限定せずに、分析物又はハイブリッド検出用に設計された二次分子を放射活性標識すること又は蛍光標識することが含まれる。遺伝子発現レベルの定量は、分析物由来のシグナル強度を既知の標準から決定された強度と比較してなされる。標準は、標的遺伝子の *in vitro* 転写、収率の定量、及びその材料を使用して標準曲線を作成することによって得られる。

### 【0031】

プロテオミック・アプローチでは、二次元（2 D）電気泳動が当技術分野でよく知られた技術である。血清のようなサンプルから各タンパク質を単離することは、通常ポリアクリルアミドゲル上で、様々な特性によりタンパク質を連続的に分離することによってなされる。先ず、タンパク質は電流を使用してサイズにより分離される。電流はすべてのタンパク質に均等に作用するので、より小さいタンパク質はより大きいタンパク質よりゲル上を遠く移動する。第二の次元では最初に対して垂直な電流を適用し、サイズではなく、各タンパク質の担う特定の電荷に基づいてタンパク質が分離される。異なる配列を有する 2 つのタンパク質がサイズと電荷の両方で一致することはないので、2 D 分離の結果は、四角いゲル

上に各タンパク質が特有のスポットを占めることになる。化学品又は抗体のプローブでスポットを分析するか、又は後続のタンパク質のミクロ配列決定により、サンプル内のある特定タンパク質の相対量やタンパク質の同一性が明らかになる。

### 【0032】

上記の試験は、多種多様な患者の細胞、体液及び / 又は組織生検及び剖検材料に由来するような組織抽出物（ホモジエネート又は可溶化組織）から派生したサンプルに対して実施し得る。本発明に有用な体液には、血液、尿、唾液、又は他の身体分泌物又はそれらの誘導物が含まれる。血液は、白血球、血漿、血清、又は血液の誘導物を包含し得る。

#### In vivo の抗体使用

B SGに対する抗体は、乳房の疾患有する患者に in vivo でも使用し得る。特に、B SGに対する抗体は、乳房の疾患有する疑いのある患者へ、診断及び / 又は治療の目的で注射され得る。例えば、インジウム - 111 で標識した抗体 - キレート剤は、癌胎児性抗原を発現する腫瘍の放射免疫シンチグラフィー造影での使用が記述されている（Sunerdon et al., Nucl. Med. Biol. 1990, 17: 245-254）。特にこのような抗体 - キレート剤は、再発性の結腸直腸癌を有する疑いのある患者の腫瘍を検出するのに使用されてきた（Giffin et al., J. Clin. Onc. 1991, 9: 631-640）。磁気共鳴映像（MRI）に使用される標識として常磁性イオンの付いた抗体についても記述されてきた（Lauffer, R. B., Magnetic Resonance in Medicine, 1991, 22: 339-342）。B SGに対して向けられた抗体も同様のやり方で使用し得る。B SGに対する標識抗体は、患者の診断又は病態の病期決定の目的で、乳癌のような乳房の疾患有する疑いのある患者へ注射され得る。使用される標識は、用いられる造影のモダリティに応じて選択される。例えば、インジウム - 111、テクネチウム - 99m 又はヨウ素 - 131 のような放射活性標識は、二次元スキャン又はシングルフォトンエミッショ n コンピュータ断層撮影法（SPECT）に使用し得る。フッ素 - 19 のような陽電子放射標識は、陽電子放射断層撮影法に使用し得る。ガドリニウム（111）又はマンガン（111）のような常磁性イオンは、磁気共鳴映像に使用し得る。乳房の内

部又は乳房の外部に標識を定位することで疾患の広がりを決定することが可能になる。乳房内の標識の量により乳房内における癌の有無を判定することも可能になる。

### 【0033】

乳癌と診断された患者にとっては、B S Gに対する抗体を注射することが治療上の利益をもたらし得る。抗体はその治療効果を単独で発揮するかもしれない。他のやり方では、抗体は、その治療効果を増強させるために薬物、毒素又は放射性核種のような細胞毒性薬に結合される。薬物 - モノクローナル抗体については、例えば Garnett and Baldwin, Cancer Research 1986, 46: 2407-2412 により、当技術分野で記述されてきた。モノクローナル抗体に毒素を結合して様々な癌種の治療に使用することも Pastan et al., Cell 1986, 47: 641-648 に記述されている。イットリウム - 90 で標識したモノクローナル抗体については、正常組織に対する毒性を制限しながら腫瘍へ最大用量をデリバリーすることが記述されている ( Goodwin and Mares, Cancer Supplement 1997, 80: 2675-2680)。限定しないが、銅 - 67、ヨウ素 - 131 及びレニウム - 186 を含む、他の細胞毒性の放射性核種も B S Gに対する抗体の標識に使用し得る。

### 【0034】

上記 *in vivo* の方法に使用し得る抗体には、ポリクローナル及びモノクローナル抗体と分子生物学の技術により製造される抗体がいずれも含まれる。抗体フラグメント、及び S E L E X として言及され、当業者によく知られている *in vitro* 進化のプロトコールから派生するようなアプタマー及び单鎖オリゴヌクレオチドも使用し得る。

### 【0035】

#### 【実施例】

本発明は以下の実施例によりよく詳しく説明される。以下の実施例は特定の態様に関連して本発明を具体的に説明するためにのみ提供される。これら典型的な実施例は、本発明の特定の側面を説明するが、限定的なことを示したり、開示された発明の範囲を制限するものではない。

実施例 1.

diadexus LLC, サンタクララ、CAが開発したデータマイニング用のCancer Leads Automatic Search Pack age(CLASP)を使用して、Incyte Pharmaceuticals, パロアルト、CAより入手可能なLIFESEQデータベースのデータを体系的に分析することにより、BSGの同定を実施した。

#### 【0036】

CLASPは以下の工程を実施する：

標的臓器における対応ESTの(他の全臓器と比較した)アバンダンスレベルに基づいて、高度に発現されている臓器特異的な遺伝子を選択すること。

#### 【0037】

高度に発現されている臓器特異的遺伝子のそれぞれについて、正常、腫瘍組織、罹患組織及び腫瘍又は疾患に関連した組織ライブラリーにおける発現レベルを分析すること。

#### 【0038】

成分ESTが腫瘍ライブラリーに専ら又はより頻繁に見出されたことを示す候補遺伝子を選択すること。

CLASPにより、乳癌の診断に有用な高度に発現されている臓器及び癌特異遺伝子を同定することが可能になる。

#### 【0039】

【表1】

表1：BSG配列

SEQ	ID NO:	LS クローン ID	LSA 遺伝子 ID
1		2740238 (Mam002)	242151
2		1730886 (Mam001)	238469
3		y155b03 (Mam005)	348845
4		2613064 (Mam004)	27052
5		894184	221086
6		2299454	27681
7		2258254	248176
8		789767	156580
9		1213903	219737

## 【0040】

以下の実施例は、詳しく説明される場合を除くと、当業者によく知られていて常法となっている標準技術を使用して実施した。以下の実施例にある定的な分子生物学の技術は、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, 2nd. Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1989) のような標準実験マニュアルに記載の通りに実施し得る。

## 実施例2：遺伝子発現の比較定量

蛍光Taqmanプローブを用いるリアルタイム定量PCRは、Taq DNAポリメラーゼの5' - 3' ヌクレアーゼ活性を利用する定量的な検出系である。この方法では、5' のレポーター色素と下流の3' 消光色素で標識された内部蛍光オリゴヌクレオチドプローブ(Taqman)が使用される。PCRの間に、Taq DNAポリメラーゼの5' - 3' ヌクレアーゼ活性によりレポーターが放出され、次いでModel 7700 Sequence Detection System(PE Applied Biosystems, フォスター・シティ、CA, アメリカ)のレーザー検出器によりその蛍光を検出し得る。

## 【0041】

内因性対照物を増幅して、反応に加えられるサンプルRNAの量を標準化し、逆転写酵素(RT)の効率を正規化するのに使用した。この内因性対照物として使用したのは、シクロフィリン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)又は18SリボソームRNA(rRNA)のいずれかである。試験した全サンプル間の相対量を算出するために、1つのサンプルの標的RNAレベルを比較結果の基準値(キャリブレータ)として使用した。「キャリブレータ」に対する相対量は、標準曲線を使用するか又は比較法(User Bulletin #2: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System)により得ることができる。乳房特異マーカー(BSM)である、Mam001(SEQ ID NO:2)、Mam002(SEQ ID NO:1)、Mam004(SEQ ID NO:4)及びMam005(SEQ ID NO:3)の正常組織及び癌組織の組織分布及びレベルを評価するために、癌及び対等の(matched)正常隣接組織(NAT)と、対等で

ない ( unmatched ) 癌及び正常組織から全RNAを抽出した。次いで、逆転写酵素を用いて第一のcDNA鎖を製造し、Mam001 ( SEQ ID NO : 2 )、Mam002 ( SEQ ID NO : 1 )、Mam004 ( SEQ ID NO : 4 ) 及びMam005 ( SEQ ID NO : 3 ) のそれぞれに特異的なプライマ - 及び T a q m a n プローブを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応を実施した。この結果は、ABI PRISM 7700 Sequence Detector を使用して得られる。以下の数字は、それぞれのキャリブレータに比較した、Mam001 ( SEQ ID NO : 2 )、Mam002 ( SEQ ID NO : 1 )、Mam004 ( SEQ ID NO : 4 ) 及びMam005 ( SEQ ID NO : 3 ) の相対発現レベルである。

SEQ ID NO : 2 ; クローンID : 1730886 ; 遺伝子ID : 238469 ( Mam001 ) の測定

表2に示す数字は、精巢 ( キャリブレータ ) に比較した 12 種の正常組織におけるMam001 ( SEQ ID NO : 2 ) の相対発現レベルである。これらのRNAサンプルは、市販品から入手したものと様々な個人の特定組織由来のサンプルをプールして產生したものである。

### 【0042】

#### 【表2】

表2：プールしたサンプルにおけるMam001 ( SEQ ID NO : 2 ) の相対発現レベル

組織	正常
脳	0
心臓	0
腎臓	0
肝臓	0
肺	0
乳房	6
前立腺	0
筋肉	0
小腸	0
精巣	1
胸腺	0
子宮	0

### 【0043】

表2の相対発現レベルは、Mam001 ( SEQ ID NO : 2 ) のmRN

A発現が正常な乳房及び精巣のプールでは検出されるものの、分析した他の10種の正常組織プールでは検出されないことを示す。上記の結果は、Mam001(SEQ ID NO:2)のmRNA発現が乳房組織にごく特異的であり、精巣にも見出されることを示す。男性特有の組織における発現は女性特有の組織の癌を検出することに無関係である。

#### 【0044】

表2に示す組織は様々な個人からプールされたサンプルである。表3に示す組織は各個人から得たものであり、プールされたものではない。従って、表2に示されるmRNA発現レベルについての数値は、表3に示される数値と直接は比較し得ない。

#### 【0045】

表3に示される数字は、24対の対等サンプルにおける、精巣(キャリブレータ)に比較したMam001(SEQ ID NO:2)の相対発現レベルである。各対等の対には、同一の個人に由来する、特定組織の癌サンプルとその同一組織の正常隣接組織(NAT)サンプルが含まれる。

#### 【0046】

#### 【表3】

表3：個別サンプルにおけるMam001(SEQ ID NO: 2)の相対発現レベル

サンプルID	組織	癌	対等の正常
Mam 47XP	乳腺	0	0
Mam A06X	乳腺	2.3	1
Mam B011X	乳腺	0	5
Mam 603X/C034	乳腺	0	2.10
Mam 162X	乳腺	1.96	0.15
Mam 42DN	乳腺	0.38	1.27
Mam S079	乳腺	0.34	0.36
Mam S123	乳腺	0.03	0.87
Mam S516	乳腺	0.43	0.53
Mam S699	乳腺	0.40	0.66
Mam S997	乳腺	0.41	0.51
Sto AC44	胃	0	0
TST 39X	精巣	0	0
Cln SG45	結腸	0	0
Cln TX01	結腸	0	0
Cvx NK23	頸部	0	0
Cvx NK24	頸部	0	0
Endo 3AX	子宮内膜	0	0
Endo 4XA	子宮内膜	0	0
Endo 5XA	子宮内膜	0	0
Kid 11XD	腎臓	0	0
Kid 5XD	腎臓	0	0
Lng C20X	肺	0	0
Lng SQ56	肺	0	0

## 【0047】

8種の異なる組織を代表する表3の48サンプルのなかで、発現が見られるのは乳房組織だけである。上記の結果は、表2に示した正常サンプルについて得られた組織特異性の結果を追認する。表2及び表3は、16種のヒト組織型で合わせて全60種のサンプルを表す。乳房及び精巣を除く14種の異なる組織型を代表する36個のサンプルではMam001(SEQ ID NO: 2)のmRN Aは検出されなかった(表2及び3)。乳房組織以外でMam001(SEQ ID NO: 2)が検出されるのは他の1つの組織型(精巣)だけであり、それもブールされた組織サンプルだけであって(表2)、対等の精巣癌サンプルでは検出されない(表3)。

## 【0048】

同一の個人由来の乳癌サンプルと正常隣接組織のmRNA発現レベルを比較したものを見ると、11の乳癌組織サンプルのうち、Mam001(SEQ ID NO: 2)が対応する正常隣接組織に比べてより高いレベルで発現されて

いるのは2つ(Mam A06X及びMam 162X)である。乳癌におけるMam001(SEQ ID NO:2)の発現レベルが正常隣接組織に比較して低いのは4つの対等サンプル(Mam B011X, Mam 603X / CO34, Mam 42DN及びMam S123)である。発現が検出されなかつたのは1つの対等サンプルセット(Mam 47XP)である。同等レベル又は近似レベルの発現が検出されたのは他の4つの対等サンプルである(Mam S079, Mam S516, Mam S699及びMam S997)。しかしながら、癌の重量が増加すると、上記の例では発現の総量も全体に増加する可能性がある。

#### 【0049】

11個体の6つで見られた高レベルの組織特異性と増加又は同等の発現は、Mam001(SEQ ID NO:2)がmRNAを用いて乳癌細胞を検出するための診断マーカーになることを裏付けている。

SEQ ID NO:1; クローンID: 2740238; 遺伝子ID: 242151(Mam002)の測定

表4に示す数字は、胸腺(キャリブレータ)に比較した12種の正常組織におけるMam002(SEQ ID NO:1)の相対発現レベルである。これらのRNAサンプルは、市販品から入手したものと様々な個人の特定組織由来のサンプルをプールして產生したものである。

#### 【0050】

【表4】

表4：プールしたサンプルにおけるMam002 (SEQ ID NO: 1) の相対発現  
レベル

組織	正常
脳	0. 0 3
心臓	0. 0 1
腎臓	0
肝臓	0
肺	0. 0 6
乳房	2 8 9. 0 1
筋肉	0
前立腺	0. 3 1
小腸	0
精巣	0. 0 8
胸腺	1. 0 0
子宮	0

#### 【0051】

表2の相対発現レベルは、Mam002 (SEQ ID NO: 1) のmRNA発現が正常な乳房のプールでは高レベルで検出されるものの、分析した他の1種の正常組織プールではごく低いレベルで検出されることを示す。上記の結果は、Mam002 (SEQ ID NO: 2) のmRNA発現が乳房組織にごく特異的であることを示す。

#### 【0052】

表4に示す組織は様々な個人からプールされたサンプルである。表5に示す組織は各個人から得たものであり、プールされたものではない。従って、表4に示されるmRNA発現レベルについての数値は、表5に示される数値と直接は比較し得ない。

#### 【0053】

表5に示される数字は、27対の対等サンプルにおける、胸腺（キャリブレータ）に比較したMam002 (SEQ ID NO: 1) の相対発現レベルである。各対等の対には、同一の個人に由来する、特定組織の癌サンプルとその同一組織の正常隣接組織（NAT）サンプルが含まれる。さらに、正常組織由来の2つの非対等乳房サンプルと、1つの非対等卵巣癌及び1つの正常（非癌性）卵巣サンプルも試験した。

#### 【0054】

#### 【表5】

表5：個別サンプルにおけるMam002 (SEQ ID NO: 1) の相対発現レベル

サンプルID	組織	発現	対等の正常
Mam 12X	乳腺	7.2	6.9
Mam 42DN	乳腺	10.51	20.75
Mam 59X	乳腺	7.0	15.5
Mam A06X	乳腺	16.55	17.81
Mam B011X	乳腺	32.1	23.11
Mam S127	乳腺	1.73	0
Mam S516	乳腺	9.72	69.95
Mam S699	乳腺	83.46	75.65
Mam S854	乳腺	133.23	836.56
Mam S967	乳腺	59.77	188.28
Mam S997	乳腺	94.14	73.64
Mam 162X	乳腺	674.0	31.1
Mam C012	乳腺	N/A	11379.3
Mam C034	乳腺	N/A	3502.6
Mam S079	乳腺	11772.5	903.5
Mam S123	乳腺	3.4	170.5
Ovr 103X	卵巣	0	0
Ovr 1118	卵巣	0.13	N/A
Ovr 35GA	卵巣	N/A	N/A 0.13
Utr 23XU	子宮	5.6	0
Utr 135XO	子宮	0	0
Cvx NK24	頸部	0.9	1.4
End 4XA	子宮内膜	32.2	0
Cin AS43	結腸	2.3	0
Cin AS45	結腸	0	0
Cin RC01	結腸	0.2	0
Lng AC90	肺	0	2.0
Lng LC109	肺	0	0.6
Lng SC32	肺	0.8	0
Sto AC93	胃	0	0
Tst 39X	精巢	1.97	0

## 【0055】

9種の異なる組織を代表する表5の58サンプルのなかで、最高の発現が見られるのは乳房組織である。発現を示す非乳房組織のなかで試験した大多数の乳房サンプルに匹敵する発現を示したのは1つのサンプル (End 4XA) だけである。このサンプルは子宮内膜組織であり、これは女性特有の組織である。上記の結果は、表4に示した正常サンプルについて得られた組織特異性の結果を追認する。表4及び表5は、17種のヒト組織型で合わせて全70種のサンプルを表す。乳房を除く11種の異なる組織型を代表する22個のサンプルではMam002 (SEQ ID NO: 1) のmRNAは検出されなかった(表4及び5)。

。

## 【0056】

同一の個人由来の乳癌サンプルと正常隣接組織のmRNA発現レベルを比較したものを見ると表5に示す。13の対等乳癌組織のうち、Mam002 (SEQ ID

NO : 1 ) が対応する正常隣接組織に比べてより高いレベルで発現されているのは 3 つ ( サンプル : Mam S 127 、 Mam 162X 及び Mam S 079 ) である。乳癌における Mam 002 ( SEQ ID NO : 1 ) の発現レベルが正常隣接組織に比較して低いのは 8 人のサンプル ( Mam 12X 、 Mam 42DN 、 Mam 59X 、 Mam B 011X 、 Mam S 516 、 Mam S 854 、 Mam S 967 及び Mam S 123 ) である。同等レベル又は近似レベルの発現が検出されたのは他の 3 つの対等サンプル ( サンプル : Mam A 06X 、 Mam S 699 及び Mam S 997 ) である。

#### 【0057】

この高レベルの組織特異性は、 Mam 002 ( SEQ ID NO : 1 ) が mRNA を用いて乳癌細胞を検出すための診断マーカーになることを裏付けている。乳房組織は、この遺伝子の発現がこれまでに検出された唯一の有意な源である。 13 の対等サンプルのうち 8 つが正常隣接組織より癌においてより低い発現を有する。従って、この遺伝子の発現減少が癌の存在の診断となる可能性がある。

SEQ ID NO : 4 ; クローン ID : 2613064 ; 遺伝子 ID : 27052 ( Mam 004 ) の測定

表 6 に示す数字は、乳房 ( キャリブレータ ) に比較した 12 種の正常組織における Mam 004 ( SEQ ID NO : 4 ) の相対発現レベルである。これらの RNA サンプルは、市販品から入手したものと様々な個人の特定組織由来のサンプルをプールして產生したものである。

#### 【0058】

#### 【表 6 】

表6：プールしたサンプルにおけるMam004 (SEQ ID NO: 4) の相対発現レベル

組織	正常
脳	0. 059
心臓	0. 131
腎臓	0. 018
肝臓	0
肺	0. 478
乳房	1. 000
前立腺	0. 459
筋肉	0. 003
小腸	0. 048
精巣	0. 130
胸腺	0. 030
子宮	0. 071

### 【0059】

表6の相対発現レベルは、Mam004 (SEQ ID NO: 4) のmRNA A発現が正常な乳房と、肺、前立腺、精巣及び心臓を含む他の組織のプールで検出されることを示す。上記の結果は、正常な乳房組織においてより高く発現されるものの、Mam004 (SEQ ID NO: 4) のmRNA発現が乳腺に特異的はないことを示す。

### 【0060】

表6に示す組織は様々な個人からプールされたサンプルである。表7に示す組織は各個人から得たものであり、プールされたものではない。従って、表6に示されるmRNA発現レベルについての数値は、表3に示される数値と直接は比較し得ない。

### 【0061】

表7に示される数字は、23対の対等サンプルにおける、乳房（キャリブレータ）に比較したMam004 (SEQ ID NO: 4) の相対発現レベルである。各対等の対には、同一の個人に由来する、特定組織の癌サンプルとその同一組織の正常隣接組織（NAT）サンプルが含まれる。

### 【0062】

#### 【表7】

表7：個別サンプルにおけるMam004 (SEQ ID NO: 4) の相対発現レベル

サンプルID	組織	癌	対等の正常
Mam 12B	乳房	0	0
Mam 12X	乳房	1.3. 454	0
Mam 603X	乳房	3.0. 484	0
Mam 59X	乳房	1. 306	0
Mam 162X	乳房	0. 71	0. 04
Mam 42DN	乳房	0. 25	2. 17
Mam S079	乳房	42. 18	0. 47
Mam S123	乳房	0. 01	0
Mam S516	乳房	1. 17	0. 41
Mam S699	乳房	0. 11	0. 55
Mam S997	乳房	10. 43	1. 29
Sto AC44	胃	0. 61	0
Cln SG45	結腸	0. 04	0
Cln TX01	結腸	0	0
Cvx NK23	頸部	0	0
Cvx NK24	頸部	0	0
Endo 3AX	子宮内膜	0	0
Endo 4XA	子宮内膜	0	0
Endo 5XA	子宮内膜	0	2. 73
Kid 11XD	腎臓	0	0
Kid 5XD	腎臓	0	2. 63
Lng C20X	肺	0	0
Lng SQ56	肺	10. 37	0

## 【0063】

7種の異なる組織を代表する表7の46サンプルの中で、発現が最も高いのは乳房組織、特に癌である。乳房サンプルに見られるものに匹敵する発現が見られるのは、4つの肺サンプルの1つ(サンプル23)、4つの腎臓サンプルの1つ(サンプル21)、及び6つの子宮内膜サンプルの1つ(サンプル19)である。表6及び表7は、16種のヒト組織型で合わせて全58種のサンプルを表す。乳房を除く7種の異なる組織型を代表する20個のサンプルではMam004 (SEQ ID NO: 4) のmRNAは検出されなかった(表6及び7)。

## 【0064】

同一の個人由来の乳癌サンプルと正常隣接組織のmRNA発現レベルを比較したものを表7に示す。11の乳癌組織のうち、Mam004 (SEQ ID NO: 4) が対応する正常隣接組織に比べてより高いレベルで発現されているのは8つ(Mam 12X、Mam 603X、Mam 59X、Mam 162X、Mam S079、Mam S123、Mam S516及びMam S99

7)である。乳癌におけるMam004(SEQ ID NO:4)の発現レベルが正常隣接組織に比較して低いのは2つの対等サンプル(Mam 42DN及びMam S699)である。発現が検出されなかつたのは1つの対等サンプルセット(Mam 12B)である。

### 【0065】

正常隣接組織に比較して大多数の対等癌サンプルで発現が上昇していることは、Mam004(SEQ ID NO:4)がmRNAを用いて乳癌細胞を検出するための診断マーカーになることを裏付けている。

SEQ ID NO:3; クローンID:y155b03; 遺伝子ID:348845(Mam005)の測定

表8に示す数字は、精巣(キャリブレータ)に比較した12種の正常組織におけるMam005(SEQ ID NO:3)の相対発現レベルである。これらのRNAサンプルは、市販品から入手したものと様々な個人の特定組織由来のサンプルをプールして產生したものである。

### 【0066】

#### 【表8】

表8: プールしたサンプルにおけるMam005(SEQ ID NO:3)の相対発現レベル

組織	正常
脳	0
心臓	0.0002
腎臓	0.0001
肝臓	0
肺	0
乳房	5.4076
筋肉	0
前立腺	0
小腸	0
精巣	1
胸腺	0
子宮	0

### 【0067】

表2の相対発現レベルは、Mam005(SEQ ID NO:3)のmRNA発現が正常な乳房及び精巣のプールでは検出されるものの、分析した他の10

種の正常組織プールでは有意なレベルで検出されないことを示す。上記の結果は、M a m 0 0 5 ( S E Q I D N O : 3 ) のm R N A 発現が乳房組織にごく特異的であり、精巣にも見出されることを示す。男性特有の組織における発現は女性特有の組織の癌を検出することに無関係である。

#### 【0068】

表8に示す組織は様々な個人からプールされたサンプルである。表9に示す組織は各個人から得たものであり、プールされたものではない。従って、表8に示されるm R N A 発現レベルについての数値は、表9に示される数値と直接は比較し得ない。

#### 【0069】

表9に示される数字は、46対の対等サンプルにおける、精巣(キャリブレータ)に比較したM a m 0 0 5 ( S E Q I D N O : 3 )の相対発現レベルである。各対等の対には、同一の個人に由来する、特定組織の癌サンプルとその同一組織の正常隣接組織サンプルが含まれる。さらに、正常組織由来の2つの非対等乳房サンプルと、1つの非対等卵巣癌及び1つの正常(非癌性)卵巣サンプルも試験した。

#### 【0070】

【表9】

表9：個別サンプルにおけるMam005 (SEQ\_ID\_NO:3) の相対発現レベル

サンプルID	組織	値	対等の正常
Mam_12X	乳腺	0.33	0.71
Mam_42DN	乳腺	0.22	0.63
Mam_59X	乳腺	0.03	0.23
Mam_A06X	乳腺	70.77	0.56
Mam_B011X	乳腺	0.03	1.52
Mam_162X	乳腺	0.43	0.09
Mam_C012	乳腺	N/A	N/A
Mam_C034	乳腺	N/A	1.6
Mam_S079	乳腺	0.22	0.13
Mam_S123	乳腺	0.01	0.23
Mam_S127	乳腺	0	0.28
Mam_S516	乳腺	0.15	0.05
Mam_S699	乳腺	0.21	0.42
Mam_S854	乳腺	1.12	0.54
Mam_S967	乳腺	30.61	0.54
Mam_S997	乳腺	0.40	0.22
Mam_14DN	乳腺	0.07	0
Mam_699F	乳腺	0.01	0.09
Mam_S621	乳腺	1.82	0
Mam_S918	乳腺	6.89	1.06
Cln_CM67	結腸	0	0
Cln_DC19	結腸	0	0
Cln_AS43	結腸	0	0
Cln_AS45	結腸	0	0
Cln_RC01	結腸	0.0012	0.0003
Lng_AC90	肺	0	0
Lng_LC109	肺	0	0
Lng_SQ32	肺	0	0
Lng_SQ43	肺	0	0
Ovr_103X	卵巣	0	0
Ovr_1118	卵巣	0	N/A
Ovr_A084	卵巣	0	0
Ovr_G021	卵巣	0	0
Ovr_35GA	卵巣	N/A	N/A
Cvx_NK23	頸部	0	0
Cvx_NK24	頸部	0	0
Endo_3AX	子宮内膜	0	0
End_4XA	子宮内膜	0	0
Sto_758S	胃	0	0
Sto_AC44	胃	0	0
Sto_AC93	胃	0	0
Tst_39X	精巢	0.01	0.01
Utr_85XU	子宮	0	0
Utr_135XO	子宮	0	0
Utr_23XU	子宮	0	0
Kid_124D	腎臓	0	0
Lvr_15XA	肝臓	0	0
Pan_CO44	肺臓	0	0
Skn_448S	皮膚	0	0
Smint_21XA	小脳	0	0

【0071】

14種の異なる組織を代表する表9の96サンプルのなかで、有意な発現が見られるのは乳房組織だけである。上記の結果は、表8に示した正常サンプルについて得られた組織特異性の結果を追認する。表8及び表9は、18種のヒト組織

型で合わせて全108種のサンプルを表す。乳房及び精巣を除く16種の異なる組織型を代表する67個のサンプルではMam005(SEQ ID NO:3)のmRNAはまったく検出されなかつたか、又はごく低いレベルの検出しかなかつた(表8及び9)。

### 【0072】

同一の個人由来の乳癌サンプルと正常隣接組織のmRNA発現レベルを比較したものを見表9に示す。18組の癌及び正常サンプルのうち、Mam005(SEQ ID NO:3)が対応する正常隣接組織に比べてより高いレベルで発現されているのは10組(Mam A06X、Mam 162X、Mam S079、Mam S516、Mam S854、Mam S967、Mam S997、Mam 14DN、Mam S621及びMam S918)である。乳癌におけるMam005(SEQ ID NO:3)の発現レベルが正常隣接組織に比較して低いのは8つの癌及び正常隣接組織サンプル(Mam 12X、Mam 42DN、Mam 59X、Mam B011X、Mam S123、Mam S127、Mam S699及びMam S699F)である。発現が検出されなかつたのは2つの対等サンプルである。

### 【0073】

18の対等な癌及び正常隣接組織サンプルのうち10で見られた高レベルの組織特異性及び過剰発現は、Mam005(SEQ ID NO:3)がmRNAを用いて乳癌細胞を検出するための診断マーカーになることを裏付けている。

### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Sun, Yongming  
Recipient, Herve  
Cafferkey, Robert  
DIADEXUS LLC

<120> A NOVEL METHOD OF DIAGNOSING, MONITORING, STAGING ,  
IMAGING AND TREATING BREAST CANCER

<130> DEX-0040

<140>

<141>

<150> 60/095,232

<151> 1998-08-04

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 544

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> (505)..(506)

<220>

<221> unsure

<222> (510)

<220>

<221> unsure

<222> (521)

<220>

<221> unsure

<222> (527)..(528)

<220>

<221> unsure

<222> (531)

<220>







```

<220>
<221> unsure
<222> {201}

<220>
<221> unsure
<222> {205}

<220>
<221> unsure
<222> {238}

<220>
<221> unsure
<222> {241}..{242}

<220>
<221> unsure
<222> {250}

<400> 6
gaacagccctc actttgttgc ctgtcaatgc cagttagggca ggcaggaaatg cagcagagag 60
gactcgccatc cgtggccattt gtgttcgttgc cggcccttaca tgcctcagaa gcataacttc 120
ccattgcctc cagctgttgc acggaggattt cacatcatat ttccagaagg ctccctggaaa 180
nactgaaat gtgtccgtatc naganagctg atggggattt tgacttggct gtgtccancc 240
nncatgtcan gog 253

<210> 7
<211> 943
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> unsure
<222> {128}

<220>
<221> unsure
<222> {130}

<220>
<221> unsure
<222> {925}

<400> 7
gggggccttg cccccggccc tgtgaggacc ccgcgggtgc tgggtaaga ggctctaqac 60
ccttcaacctg tcaatcacct gagggaggct gagggccaage cccatccctc agaatcaagg 120

```

ctgtcaanen cccttcaccc gcccagtetc tgccacaccc ctcggggctg aagacggccc 180  
 tgaccaggcc ctgggcctca ggcacacccc ctcggccctt tgccctggacc caggagcac 240  
 gtgcgggggg ctcggagccc ctggtgactg tcaacgttca gtgcgccttc acatggccc 300  
 tgaggcacaq aaggaggacq gacctgtca gcttggggc acttgtggc caagccctcc 360  
 ctccacggcc ccaggcttggg caactcggtt gggccaa gccccccgtg gctgcgggtg 420  
 agctgtggcac ccccccgaact gaggcagctg ctggaaaggg gggtggccaga ggtcaactgc 480  
 ctcccttgcag gcccccacca ggaggccccc tctggggat ctctttgcag ttaccttagcc 540  
 ccagggtggg acgggcactg ggtccccc cccggggggc agtcgtgtca ggggcctgg 600  
 cgggacgcqag ctgcctggccc caggggggctg cagctgcaact gcaagggggacg cgggggttgg 660  
 cgggttctt accagggtgtt ggcacagcc agttactccg cccaggggcc agaggacctg 720  
 ggccttccgac agggggacac ggtggaccc tcgtgtggaa tggacccggc atgtgtggag 780  
 ggcacatgtg acggccgcattt cccaaatgtt tctgtggtccc cgcggccct 840  
 cggatgttgcg gagccccccgg cccctggcc cgtatccggc agggagatca gccctaata 900  
 tgctgtgtcc atgtgttta taatnaaaaa aacccttccat gca 943

<210> 8  
 <211> 249  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> unsure  
 <222> (48)

<220>  
 <221> unsure  
 <222> (110)

<220>  
 <221> unsure  
 <222> (192)

<220>  
 <221> unsure  
 <222> (205)

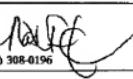
<220>  
 <221> unsure  
 <222> (218)

<400> 8  
 atcacattaa gtcattgtca attttataaa caaaaacaat ggttttantt tgcatctccc 60  
 tgatgttat tgcgttggaa catatgggaa gaagttttgtt tgcttttggm gtttttttca 120  
 tgaatagatt gtgtgcattttttttgg ggttattcgtt tttttttttac tgatgtgago 180  
 atgtgtatgg gngattattt gatgtttatc agttttgtt agtagactgg caatattttag 240  
 tttttgtgtt 249

<210> 9

<211> 690  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 gacgccccagt gacctggcga ggtcgccage acagagctct ggagatgaag accctgttcc 60  
 tgggtgtcacat ctcgcgtccg gcccgtttcac ttgtggggag gaggatataca 120  
 cagggacccgt gtacgtqaag gocatgttg tcgtataagga ctttccggag gacaggagcc 180  
 ccagggaaatgt gtcccccagtgt aagggtacac coctgggggg tgggaaatgg qaagccacgt 240  
 tcacccatcat gggggggat cgggtgcattcc agaagaaaaat ctgtatgtggg aagacccgggg 300  
 agccctggcaat atacagccgc tatggggca ggaagctcat gtaccctgtcg gagtcgccca 360  
 ggaggggacca ctacatcttt tactgcaaaag accagccacca tggggccgtg ctccacatgg 420  
 gaaagcttgtt ggttagggat tctgtatcca accggggggc ctgtggaaaga tttaagaaaat 480  
 tggtgccggc caaggacttccatcgtggggggg acattttaccc gcccctgtcg acggggaaatgt 540  
 gctgtcccgaa acatctggca gccccccgggt ctgcacccccc agagcccccacc ctaccaccc 600  
 acacagagcc cggaccaccc ggacccatccc tccagccatc accctttccctt gctcccccacc 660  
 acctgtactccaa atataaaatgtc ctttctccccc 690

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/16811
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) -Please See Extra Sheet. US CL : 433/6, 7.1, 91.2, 536/23.5, 24-31; 424/174.1; 530/388.1, 388.8 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 433/6, 7.1, 91.2, 536/23.5, 24.31; 424/174.1; 530/388.1, 388.8		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Extra Sheet.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevance to claim No.
X	US 5,668,267 A (WATSON et al) 16 September 1997, columns 6 and 7.	1-5
Y	WO 98/18945 A (ABBOTT LABORATORIES) 07 May 1998, pages 4, 7, 46 and 87.	1-5, 7, 9
X	US 5,759,776 A (SMITH et al) 02 June 1998, column 16.	1
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "D" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 21 SEPTEMBER 1999	Date of mailing of the international search report 20 OCT 1999	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer CARLA MYERS  Telephone No. (703) 308-0196	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US99/16811

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:  
IPC (6):

C12Q 1/68; C12P 19/34; C07H 21/04; A61K 16/00; G01N 33/53

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS; WEST Derwent/Bect; DIALOG; Medline, Biosis, Probase, Scienced, CA; GenBank/EMBL, n-geneseq  
search terms: breast, mammary, tumor, carcinoma, cancer, mRNA, protein, antibody, SEQ ID NO: 1-5

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マークト(参考)
A 6 1 P	35/00	C 0 7 K	16/32
C 0 7 K	16/32	C 1 2 Q	1/02
C 1 2 Q	1/02		1/68
	1/68	Z N A	A
(72) 発明者	レシポン, ハーヴ アメリカ合衆国カリフォルニア州94115, サン・フランシスコ, フォートゥナ・アベ ニュー 85	A 6 1 K	49/02
(72) 発明者	カファーキー, ロバート アメリカ合衆国カリフォルニア州95134, サン・ホセ, エラン・ヴィレッジ・レイン 350, アパートメント 218		
F ターム(参考)	4B063 QA19 CC02 CC03 CC09 CC06 QR48 QS33 Q01 4C085 AA13 AA19 AA26 AA27 BB01 CC21 G301 H+03 H-07 K403 KA28 KA29 KB07 KB09 KB12 KB15 KB18 LL18 4H045 AA11 BA10 BA50 BA71 CA40 DA76 EA28		